

34株副溶血弧菌 16S-23S rDNA 间区多态性 DGGE 分析

苏婷, 罗鹏, 胡超群, 任春华

(中国科学院南海海洋研究所海洋生物资源可持续利用重点实验室, 广东 广州 510301)

摘要: 采用 PCR-变性梯度凝胶电泳技术(PCR-DGGE)分析比较了 34 株分离于环境和水产养殖动物体内的副溶血弧菌及标准株 16S-23S rDNA 间区(Intergenic Spacer Region, ISR)的多态性和亲缘关系。结果表明, 34 株副溶血弧菌的 ISR 经 PCR-DGGE 电泳后均能分离出 4—10 条条带, 共计产生 15 个多态性位点。所有菌株聚为 H、I、J、K 四大簇, 株间遗传差异最大为株 A18 和 A25, 遗传距离达到 0.4。ISR PCR-DGGE 方法为副溶血弧菌基因分型提供了一种新的方法。

关键词: 副溶血弧菌; 16S-23S rDNA 间区; PCR-DGGE

中图分类号: S182 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2010)03-0055-06

Analysis of the polymorphism of 16S-23S rDNA intergenic spacer regions from 34 *Vibrio parahaemolyticus* strains by denaturing gradient gel electrophoresis

SU Ting, LUO Peng, HU Chao-qun, REN Chun-hua

(South China Sea Institute of Oceanology, Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, cas, Key Laboratory of Applied Marine Biology of Guangdong, Guangzhou 510301)

Abstract: Using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE), the polymorphism of 16S-23S rDNA intergenic spacer regions (ISR) from 34 *Vibrio parahaemolyticus* strains, including type strains and those isolated from environment and aquatic animals, were analyzed. The phylogenetic relationships of these strains were also analyzed. The results showed that the ISRs could be separated into 4–10 different bands through PCR-DGGE. Thirty-four *V. parahaemolyticus* strains shared 15 polymorphic sites. Using MVSP, 34 strains were clustered into four groups, H, I, J, and K. Strains A18 and A25 had farthest genetic distance, with a value of 0.4. The present study suggested that ISR PCR-DGGE provided a new method for genotyping of *V. parahaemolyticus*.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; 16S-23S rDNA intergenic spacer Regions; PCR-DGGE

副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus* 是一种广泛分布于海洋环境的革兰氏阴性嗜盐杆菌, 是引起食源性疾病的重要病原之一^[1], 同时也是引发海洋水产动物细菌性疾病的一种重要病原。1998 年以来的资料显示, 副溶血弧菌引发食物中毒的规模呈明显上升趋势, 已超过沙门氏菌食物中毒, 跃居首位^[2]。为了掌握副溶血弧菌流行病学规律, 方便对其引发疾病的预防和控制, 研究副溶血弧菌的种内多样性并进行种内分型十分必要。

按照传统的分型方法, 副溶血弧菌主要有表型分型和血清分型两种, 但这两种方法在流行病学的调查研究中局限性越来越明显, 取而代之的是基因分型方法^[3]。细菌在长期的进化过程中, rRNA 基因功能保持不变, 被认为是衡量生命进化历史最理想的标尺^[4]。rRNA 序列既具保守性又具可变性。保守性反映生物物种的亲缘性, 可变性则反映物种的变异性, 因此适合用于系统发育分析和种属分子水平的鉴定。其中, 16S rRNA 基因分子量大小适中, 约

收稿日期: 2008-03-25; 修订日期: 2008-12-02。刘学东编辑

基金项目: 国家“973”计划项目(2006CB101803); 国家自然科学基金(30700016)

作者简介: 苏婷(1985—), 女, 广西桂林市人, 硕士研究生, 从事海洋微生物学研究

通讯作者: 胡超群, Tel: 020-89023218, E-mail: cqhu@scsio.ac.cn

1540 个核苷酸, 其序列分析已经成为细菌种属鉴定、分类和系统发育分析标准的分子工具, 但此种分类方法对相近种、型和同一种内不同菌株分辨能力较差^[5]。细菌的 16S-23S rDNA 间区(16S-23S rDNA Intergenic Spacer Regions, ISR)由于没有特定功能, 在进化进程中受到更小的选择压力, 具有比 16S rDNA 更高的可变性, 进化速率比 16S rDNA 大 10 多倍^[6], 这一特点极好的弥补了 16S rDNA 相对保守, 在相近种和同一种内不同菌株间分辨力差的缺点。ISR 作为细菌分类鉴定的一个热点, 在近几年受到关注, 已经有不少关于 ISR 用于细菌分子鉴定的报道, 例如: 荧光假单胞菌、霍乱弧菌、拟态弧菌、分枝杆菌属、气单胞菌属和河口弧菌^[7]。同时 ISR 的高度可变性也提供了一个细菌种内基因分型的基础^[8]。

变性梯度凝胶电泳(DGGE), 可以用于检测单一碱基的变化和 PCR 扩增 DNA 的多态性^[9], 能将分子量相同而碱基序列有差异的 DNA 片段很好的区分出来, 是分子遗传分析强有力的工具。ISR-PCR 与 DGGE (ISR PCR-DGGE)的结合使用则可以直观、灵敏地展示细菌 ISR 的多态性, 为细菌种内遗传多样性分析提供了另外一种快速、直观、相对简单且结果稳定的方法。2001 年, Buchan 等^[8]首次用 ISR PCR-DGGE 对大肠杆菌 ISR 的多态性进行了分析, 显示出大肠杆菌丰富的遗传多样性, 展现了这种新技术的优势。但是, 至今未见 ISR-DGGE 用于弧菌属细菌和其他细菌种内遗传多样性分析的文献报道。

本文利用 ISR PCR-DGGE, 分析了 34 株副溶血弧菌 16S-23S rDNA 间区(ISR)的多态性, 显示了不同菌株间 ISR 的种类、数量和序列相似度的关系, 比较了副溶血弧菌菌株 ISR PCR-DGGE 指纹图谱的相似度和遗传距离, 为副溶血弧菌基因分型提供了一种新方法。

1 材料与方法

1.1 副溶血弧菌菌株及细菌基因组 DNA 提取

副溶血弧菌环境株分离自海水及水产动物。经 TCBS 平板培养并划线分离后, 挑取绿色菌落的菌株, 进一步用副溶血弧菌特异性显色培养基(青岛海博公司)筛选出副溶血弧菌疑似菌株。细菌经氯化钠碱性蛋白胨水(APW)(蛋白胨 10g, 氯化钠 30g, 蒸馏水 1000ml, pH 8.0)过夜培养后采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(上海华舜)提取细菌 DNA, 用作进

一步的 PCR 鉴定和后继 ISR 扩增。副溶血弧菌的鉴定分别按照 FDA 推荐的标准方法和 Kim 等^[10]的方法进行。共筛选鉴定出 32 株副溶血弧菌菌株, 它们与 2 个副溶血弧菌标准株的编号及来源见表 1。

表 1 菌株编号及来源

Tab. 1 Numbers and sources of used bacterial strains

编号	来源
A1	深圳南澳 外海水
A2	深圳南澳 藤壶 <i>Balanus</i> sp.
A3	汕头濠江 海水
A4	黄沙水产市场 波纹巴非蛤 <i>Paphia undulata</i>
A5	黄沙水产市场 刀额新对虾 <i>Metapenaeus ensis</i>
A6	黄沙水产市场 翡翠贻贝 <i>Perna viridis</i>
A7	南海环球水产市场 斑节对虾 <i>Penaeus monodon Fabricius</i>
A8	南海环球水产市场 太平洋牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>
A9	汕尾 太平洋牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>
A10	ATCC 33844
A11	ATCC 17802
A12	黄沙水产市场 斑节对虾血淋巴 <i>Penaeus monodon Fabricius</i>
A13	黄沙水产市场 溢蛭 <i>Sinonovacula constricta</i>
A14	黄沙水产市场 鸡心蛤 <i>Corculum cardissa</i>
A15	黄沙水产市场 太平洋牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>
A16	珠海 海水
A17	珠海 海水
A18	湛江东海岛 凡纳滨对虾腮 <i>Penaeus vannamei Boone</i>
A19	汕头濠江 锯缘青蟹 <i>Scylla serrata</i>
A20	黄沙水产市场 青蛤 <i>Cyclina sinensis</i>
A21	黄沙水产市场 波纹巴非蛤 <i>Paphia undulata</i>
A22	黄沙水产市场 华贵栉孔扇贝 <i>Chlamys nobilis</i>
A23	黄沙水产市场 翡翠贻贝 <i>Perna viridis</i>
A24	南海环球水产市场 凡纳滨对虾 <i>Penaeus vannamei Boone</i>
A25	汕尾 太平洋牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>
A26	中国水产科学研究院南海水产研究所提供
A27	黄沙水产市场 文蛤 <i>Meretrix meretrix</i>
A28	黄沙水产市场 刀额新对虾 <i>Metapenaeus ensis</i>
A29	黄沙水产市场 太平洋牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>
A30	黄沙水产市场 斑节对虾腮 <i>Penaeus monodon Fabricius</i>
A31	黄沙水产市场 斑节对虾血淋巴 <i>Penaeus monodon Fabricius</i>
A32	黄沙水产市场 凡纳滨对虾血淋巴 <i>Penaeus vannamei Boone</i>
A33	黄沙水产市场 华贵栉孔扇贝 <i>Chlamys nobilis</i>
A34	汕尾 凡纳滨对虾血淋巴 <i>Penaeus vannamei Boone</i>

1.2 ISR PCR 扩增及电泳

PCR 引物, 引用自 Maeda 等^[11], 并自行设计一段 GC 夹: gc-VINTF: 5'-CCCCGCCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGTGGGGTGAAGTC GTAACAAGG-3'(画线部分为 GC 夹); VINTR: 5'-TCCTTCATCGCCTCTGACTG-3'(上海生工)。反应终体积为 50μl, 反应体系包括 0.25μl Ex Taq(5U/μl)(TAKARA)、5μl 10×Ex Taq Buffer、4μl dNTP Mixture(2.5mM)、上下游引物各 1μl (20μM)、DNA 模板 2μl 和适量灭菌超纯水。反应程序如下:

94 预变性 4min; 扩增 34 个循环, 每个循环包括 94 变性 50sec、55 退火 1min、72 延伸 90sec; 最后 72 延伸 8min。1%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统成像并拍照。

1.3 PCR 产物的 DGGE

以通用突变检测系统(BioRad, USA)进行电泳。PCR 产物上样量 15 μ l。电泳条件: 6%聚丙烯酰胺胶, 变性剂浓度范围为 15%—30%(100%的变性剂包含 7M 尿素和 40%甲酰胺); 160V, 60 , 电泳 3.5h。电泳缓冲液包含: 20mM Tris, 10mM NaAc, 1mM EDTA, pH7.4。电泳结束后, 以 EB 染色 30min, 自来水漂洗 2min, 凝胶成像系统成像并拍照。

1.4 ISR-DGGE 指纹图谱分析

获得 PCR 扩增产物的 DGGE 指纹图谱后, 以

“1”和“0”记录条带的有无, 通过多变量统计分析软件包(MultiVariate Statistical Program, MVSP)计算相似度, 采用算术平均数非加权成对法(Unweighted pair-group method using an arithmetic average, UPMGA)对各样本进行聚类分析。用 Phyltools 软件计算各菌株间的遗传距离。

2 结果

2.1 ISR PCR 扩增及电泳图分析

34 株副溶血弧菌 ISR-PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果见图 1, 绝大多数副溶血弧菌菌株均能扩增出至少 3 条大小不同的带, 分别在 800bp、650bp 和 420bp 左右。有几株如 A34、A24、A25、A27 都能扩增出至少 4 条带以上。

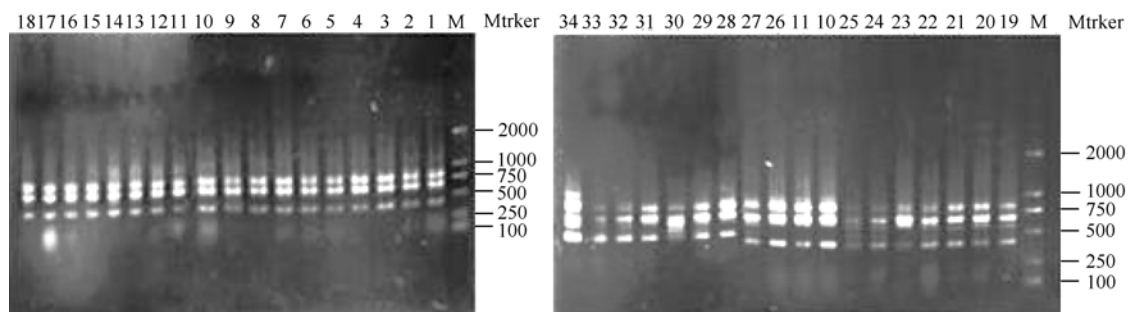


图 1 34 株副溶血弧菌 ISR-PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose electrophoresis of ISR-PCR products from 34 *V. parahaemolyticus* strains

2.2 PCR 产物的 DGGE 电泳图谱分析

PCR 产物通过 DGGE 进行分离, 所得指纹图谱显示(图 2): 各样品分离出 6—12 条条带, 多于琼脂糖凝胶电泳获得的条带。在琼脂糖电泳图中分子量约为 800bp 的条带, 在 DGGE 中分离成 2—3 条不同的条带, 而分子量约为 650bp 的条带则分离为 3—5

条不同的条带。34 株副溶血弧菌的 ISR-DGGE 共产生了 15 个多态性位点, 相对应为 1—15 号条带, 其中 1 号条带离点样孔的距离最小; 出现频率最高的为第 7 和 11 号条带, 出现在所有 34 株中; 而 1、2、3、4 号条带仅出现在 1 株中, 1 号条带是 A9 的特有条带, 2、3、4 号条带是 A34 的特有条带。另外, 比较各菌株产生的条带数, 以菌株 A34 产生的条带数为最多, 达 12 条, 其他菌株产生的条带数在 6—10 条之间。

2.3 各菌株遗传关系分析

根据 DGGE 电泳图谱, 用 MVSP 软件对不同菌株间的遗传关系进行聚类分析, 聚类图见图 3。所有菌株聚为 4 大类, 分别用 H、I、J、K 表示。其中 A25、A27、A34 聚为 H 类, 它们的相似度为 0.731; A8 单独聚为 I 类; A18、A23、A32 聚为 J 类, 它们的相似度达到 0.742; K 类中包含了其余的菌株, 它们的相似度达到 0.779。另外, I 类与 K 类又聚为一大类, 相似度为 0.711; 而 I、J、K 也聚为一大类, 相似度为 0.694。

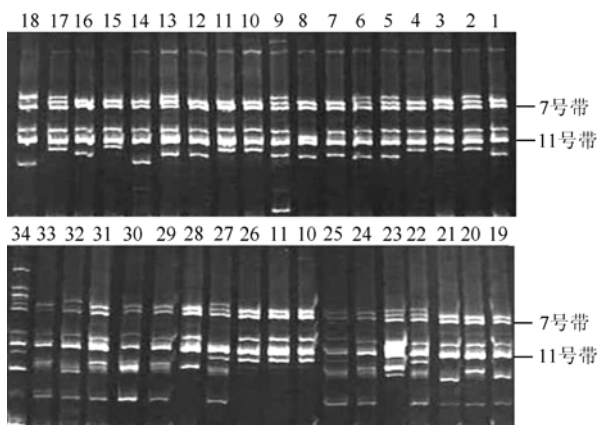


图 2 ISR-PCR 产物的 DGGE 电泳图

Fig. 2 DGGE electrophoresis of ISR-PCR products

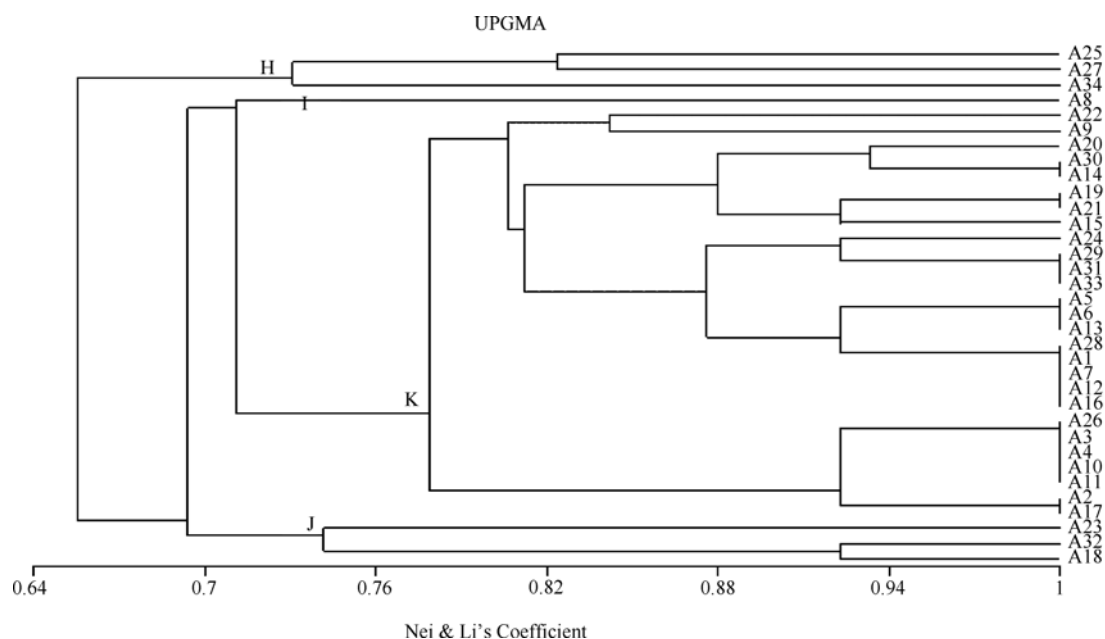


图3 34株副溶血弧菌ISR UPMGA聚类分析

Fig. 3 Clustering analysis of ISR from 34 *V. parahaemolyticus* strains through UPMGA

用Phyltools软件计算各菌株间的遗传距离,如表2所示:菌株间有的遗传差异比较大,如:A25和A18,它们的遗传距离达到了0.4。而A30与A14, A19与A21; A29、A31与A33; A5、A6与A13; A1、A7、A12、A16与A28; A3、A4、A10、A11与A26; A2与A17等这几组菌株的遗传距离均为0。

3 讨论

基因分型方法相对于传统分型方法来说操作简便、特异性强、准确性高。已报道副溶血弧菌基因分型方法有脉冲场凝胶电泳分析(Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE),随机扩增多态性DNA分析(Random amplified polymorphic DNA, RAPD),核糖体分型(Ribotyping),限制性片段长度多态性分析(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP),编码极性鞭毛的基因位点RFLP分析,肠杆菌科基因间重复序列为引物的聚合酶链式反应(Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-PCR, ERIC-PCR)等5种^[3]。另外,PCR-DGGE以其高度的灵敏性、结果直观等优点被广泛地应用于检测基因突变、单核苷酸多态性(SNP)及微生物的分子生态学分析等。我们运用ISR PCR-DGGE的方法研究副溶血弧菌16S-23S rDNA间区多态性,简单直观的表现了其数量和序列丰富的多样性。琼脂糖电泳分离出的分子量相同或相近的条带,由于DGGE能够区分单一碱基的差异,而进一步分离为更多的条带。不同菌株间条带的数量及相对位置均

不同,显示出在不同副溶血弧菌菌株16S-23S rDNA间区,相同分子量的DNA序列由于遗传的差异具有不同的碱基排列顺序。本文及Buchan^[8]的研究结果均表明,ISR-PCR结合可以高灵敏鉴别序列差异的DGGE方法,可以获得比单纯ISR-PCR琼脂糖电泳更为丰富的指纹图谱。ISR-DGGE相对于AFLP、RFLP、核糖体分型和脉冲场电泳,操作简单,成本低。相对于RAPD则具有更高的可靠性,也避免了RAPD繁琐的引物筛选过程,是一种简单有效、结果直观的研究细菌种内遗传多样性的方法。

Maeda等人^[11]根据一些大肠杆菌16S rRNA和23S rRNA的共有序列设计引物,以pT7Blue T vector为载体,PCR扩增了副溶血弧菌的16S rDNA与23S rDNA间的IGS(即ISR)并测序。结果表明副溶血弧菌的ISR共产生4种大小不同的扩增片段,分子量在391-819bp之间,其大小变异反映了ISR中tRNA基因的类型与数量的不同,最小的不含tRNA基因,最大的含有4个tRNA基因。研究还表明,他们所调查的副溶血弧菌菌株基因组至少含有9个ISR位点。而本实验结果显示,绝大多数菌株PCR产物的琼脂糖电泳都能分离出分子量大小不同的3条带(图1),因此我们推测所调查的副溶血弧菌菌株基因组至少含有3种不同分子量的ISR。而且,如果依分子量从大到小记为ISR1、ISR2和ISR3,则ISR1和ISR2的拷贝数占优势,因为它们的扩增条带明显比ISR3的亮度更高^[7]。同时,由于各类ISR中tRNA基因的序列表现出明显的株间差异,才造成了不同

表 2 34 株副溶血弧菌遗传距离比较

Tab. 2 Comparison of genetic distances among 34 *V. parahaemolyticus* strains

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	A21	A22	A23	A24	A25	A26	A27	A28	A29	A30	A31	A32	A33	A34
A1	0.00																																	
A2	0.20	0.00																																
A3	0.13	0.06	0.00																															
A4	0.13	0.06	0.00	0.00																														
A5	0.06	0.13	0.20	0.20	0.00																													
A6	0.06	0.13	0.20	0.20	0.00	0.00																												
A7	0.00	0.20	0.13	0.13	0.06	0.06	0.00																											
A8	0.13	0.33	0.26	0.26	0.20	0.20	0.13	0.00																										
A9	0.20	0.26	0.33	0.33	0.13	0.13	0.20	0.33	0.00																									
A10	0.13	0.06	0.00	0.00	0.20	0.20	0.13	0.26	0.33	0.00																								
A11	0.13	0.06	0.00	0.00	0.20	0.20	0.13	0.26	0.33	0.00	0.00																							
A12	0.00	0.20	0.13	0.13	0.06	0.06	0.00	0.13	0.20	0.13	0.13	0.00																						
A13	0.06	0.13	0.20	0.20	0.00	0.00	0.06	0.20	0.13	0.20	0.20	0.06	0.00																					
A14	0.20	0.26	0.20	0.20	0.26	0.26	0.20	0.33	0.26	0.20	0.20	0.20	0.26	0.00																				
A15	0.20	0.13	0.06	0.06	0.26	0.26	0.20	0.33	0.26	0.06	0.06	0.20	0.26	0.13	0.00																			
A16	0.00	0.20	0.13	0.13	0.06	0.06	0.00	0.13	0.20	0.13	0.13	0.00	0.06	0.20	0.20	0.00																		
A17	0.20	0.00	0.06	0.06	0.13	0.13	0.20	0.33	0.26	0.06	0.06	0.20	0.13	0.26	0.13	0.20	0.00																	
A18	0.26	0.20	0.26	0.26	0.20	0.20	0.26	0.40	0.33	0.26	0.26	0.26	0.20	0.20	0.33	0.26	0.20	0.00																
A19	0.13	0.20	0.13	0.13	0.20	0.20	0.13	0.26	0.20	0.13	0.13	0.13	0.20	0.06	0.06	0.13	0.20	0.26	0.00															
A20	0.13	0.33	0.26	0.26	0.20	0.20	0.13	0.26	0.20	0.26	0.26	0.13	0.20	0.06	0.20	0.13	0.33	0.26	0.13	0.00														
A21	0.13	0.20	0.13	0.13	0.20	0.20	0.13	0.26	0.20	0.13	0.13	0.13	0.20	0.06	0.06	0.13	0.20	0.26	0.00	0.13	0.00													
A22	0.26	0.20	0.26	0.26	0.20	0.20	0.26	0.40	0.20	0.26	0.26	0.26	0.20	0.20	0.20	0.26	0.20	0.26	0.26	0.13	0.26	0.00												
A23	0.20	0.26	0.33	0.33	0.13	0.13	0.20	0.33	0.26	0.33	0.33	0.20	0.13	0.26	0.40	0.20	0.26	0.20	0.33	0.20	0.33	0.20	0.00											
A24	0.13	0.33	0.26	0.26	0.20	0.20	0.13	0.26	0.20	0.26	0.26	0.13	0.20	0.20	0.20	0.13	0.33	0.40	0.13	0.13	0.13	0.26	0.20	0.00										
A25	0.40	0.33	0.26	0.26	0.46	0.46	0.40	0.40	0.46	0.26	0.26	0.40	0.46	0.20	0.20	0.40	0.33	0.40	0.26	0.26	0.26	0.26	0.33	0.26	0.00									
A26	0.13	0.06	0.00	0.00	0.20	0.20	0.13	0.26	0.33	0.00	0.00	0.13	0.20	0.20	0.06	0.13	0.06	0.26	0.13	0.26	0.13	0.26	0.33	0.26	0.26	0.00								
A27	0.46	0.26	0.33	0.33	0.40	0.40	0.46	0.33	0.40	0.33	0.33	0.46	0.40	0.26	0.26	0.46	0.26	0.33	0.33	0.33	0.33	0.20	0.40	0.46	0.20	0.33	0.00							
A28	0.00	0.20	0.13	0.13	0.06	0.06	0.00	0.13	0.20	0.13	0.13	0.00	0.06	0.20	0.20	0.00	0.20	0.26	0.13	0.13	0.13	0.26	0.20	0.13	0.40	0.13	0.46	0.00						
A29	0.06	0.26	0.20	0.20	0.13	0.13	0.06	0.20	0.13	0.20	0.20	0.06	0.13	0.13	0.13	0.06	0.26	0.33	0.06	0.06	0.06	0.20	0.26	0.06	0.33	0.20	0.40	0.06	0.00					
A30	0.20	0.26	0.20	0.20	0.26	0.26	0.20	0.33	0.26	0.20	0.20	0.20	0.26	0.00	0.13	0.20	0.26	0.20	0.06	0.06	0.06	0.20	0.26	0.20	0.20	0.20	0.26	0.20	0.13	0.00				
A31	0.06	0.26	0.20	0.20	0.13	0.13	0.06	0.20	0.13	0.20	0.20	0.06	0.13	0.13	0.13	0.06	0.26	0.33	0.06	0.06	0.06	0.20	0.26	0.06	0.33	0.20	0.40	0.06	0.00	0.13	0.00			
A32	0.33	0.26	0.33	0.33	0.26	0.26	0.33	0.46	0.26	0.33	0.33	0.33	0.26	0.13	0.26	0.33	0.26	0.06	0.20	0.20	0.20	0.20	0.26	0.33	0.33	0.33	0.26	0.33	0.26	0.13	0.26	0.00		
A33	0.06	0.26	0.20	0.20	0.13	0.13	0.06	0.20	0.13	0.20	0.20	0.06	0.13	0.13	0.13	0.06	0.26	0.33	0.06	0.06	0.06	0.20	0.26	0.06	0.33	0.20	0.40	0.06	0.00	0.13	0.00	0.26	0.00	
A34	0.53	0.33	0.40	0.40	0.46	0.46	0.53	0.66	0.46	0.40	0.40	0.53	0.46	0.33	0.33	0.53	0.33	0.40	0.40	0.40	0.40	0.26	0.46	0.53	0.40	0.40	0.33	0.53	0.46	0.33	0.46	0.33	0.46	0.00

菌株的各类 ISR 在 DGGE 中条带数目的不同。当然,要确定这些条带所包含的 tRNA 基因的具体序列信息还需要进一步的测序与比对。

我们根据 PCR-DGGE 展现出不同菌株间 ISR 多态性,比较它们的遗传相似度和遗传距离后发现(图 3、表 2):海水及水产动物体内的副溶血弧菌具有丰富的遗传多样性。部分菌株间的遗传差异较大,如采自汕尾太平洋牡蛎的 A25 和湛江东海岛凡纳滨对虾腮部的 A18,它们的遗传距离达到 0.4。有些菌株则显示出较高的相似度,反映出它们具有更近的亲缘关系。如采自深圳南澳海外海水的 A1 和采自珠海海水的 A16,它们的遗传距离为 0。而菌株的遗传相似性与时间、地理位置、宿主等没有明显的相关性,不同时间、不同地点与不同宿主来源的菌株往往相同,如 A26 和 A3 及 A11 和 A10。综合以上分析表明 ISR PCR-DGGE 可以为副溶血弧菌的基因分型提

供一种新的方法。

据报道,一些致病菌的诸多毒力因子由染色体上成簇存在的一组称为毒力岛的基因所编码,而已知的毒力岛中共约有 50%与染色体上的 tRNA 位点密切相关^[12],同时 tRNA 的主要功能是活化和转运专一性的氨基酸。而 tRNA 基因位于 ISR 上,因此,有可能 ISR 序列的异质性可以反映某些细菌种内毒力株与非毒力株间的差异。根据 DGGE 电泳结果,标准株 A11 所产生的条带数量与类型都与 A3、A4、A10、A26 相同,即 tRNA 基因的种类和数量甚至在染色体中的位置都很可能相同。而 A11 经毒力实验验证为致病株,所以我们推测这几株副溶血弧菌与 A11 很可能具有相同的致病性,当然这仍需要进一步的毒力实验来证明。假如存在这种情况,很可能基于 ISR PCR-DGGE 的基因分型也将为副溶血弧菌毒力群体的鉴定提供一种新的方法。

参考文献

- [1] JOSEPH S W, COLWELL R R, KAPER J B. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios[J]. Crit Rev microbiol, 1983, 10: 77-123.
- [2] 刘秀梅. 食源性疾病监控技术的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(1): 3-9.
- [3] 蔡潭溪, 蒋鲁岩, 黄克和, 等. 副溶血弧菌基因分型和检测的研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(2): 265-267.
- [4] 李鹏, 马艳姣, 赵云. 16S rRNA、23S rRNA 及 16S-23S rRNA 基因在细菌分离与鉴定中的应用[J]. 现代畜牧兽医, 2008, 7: 49-52.
- [5] 焦振泉, 刘秀梅. 细菌分类与鉴定的新热点: 16S-23SrDNA 间区[J]. 微生物学通报, 2001, 28(1): 85-89.
- [6] GÜRTLER V, STANISICH V A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region[J]. Microbiology, 1996, 142: 3-16.
- [7] 邓先于, 王智学, 何建国. 3株杂色鲍致病菌 - 副溶血弧菌的 16S-23SrDNA 间区序列的分析[J]. 微生物学报, 2004, 44(3): 304-308.
- [8] BUCHAN A, ALBER M, HODSON R E. Strain-specific differentiation of environmental *Escherichia coli* isolates via denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of the 16S-23S rDNA intergenic spacer region[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2001, 35(3): 313-321.
- [9] GULDBERG P, HENRIKSEN K F, GÜTTLER F. Molecular analysis of phenylketonuria in denmark: 99% of the mutations detected by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Genomics, 1993, 17(1): 141-146.
- [10] KIM Y, OKUDA B, MATSUMOTO J, et al. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the targeted to the *toxR* gene[J]. Clin Microbiol, 1999, 37: 1173-1177.
- [11] MAEDA T, TAKADA N, FURUSHITA M, et al. Structural variation in the 16S-23S rRNA intergenic spacers of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 192: 73-77.
- [12] 王蕾, 叶长芸, 赵爱兰, 等. 致泄性大肠杆菌和福氏 2a 志贺氏菌染色体上毒力岛和基因组岛插入相关的 tRNA 位点的研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(6): 523-526.